

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 ⁴ C12N 9/02, 15/00		A1	(11) 国際公開番号 WO 90/01542
			(43) 国際公開日 1990年2月22日(22.02.90)
(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00811 (22) 国際出願日 1989年8月9日 (09. 08. 89) (30) 優先権データ 特願昭63-199295 1988年8月9日 (09. 08. 88) JP 特願昭63-204173 1988年8月17日 (17. 08. 88) JP		(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書	
(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) (JP/JP) 〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者: よび (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 風見 潤 (KAZAMI, Jun) (JP/JP) 〒248 神奈川県鎌倉市津西2丁目1-20 Kanagawa, (JP) 中村春次 (NAKAMURA, Haruji) (JP/JP) 〒254 神奈川県平塚市宮町11-27 Kanagawa, (JP) 後藤俊夫 (GOTO, Toshio) (JP/JP) 〒454 愛知県名古屋市中川区八熊1丁目3-9 Aichi, (JP)			
(54) Title: LUCIFERASE, LUCIFERASE-CODING GENE, AND PROCESS FOR PREPARING LUCIFERASE (54) 発明の名称 ルシフェラーゼ、それをコードする遺伝子およびルシフェラーゼの生産方法			
(57) Abstract <p>Luciferase having the amino acid sequence of Fig. 1 and a gene coding it are disclosed. In addition, a recombinant vector DNA wherein the luciferase-coding gene is connected to the downstream portion of a promoter capable of expressing in each host cell, a transformant obtained by transforming each host cell by the vector DNA, and a process for preparing luciferase using such transformants are also disclosed.</p>			
<pre> 10 20 Met Lys Leu Ile Ile Leu Ser Ile Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Val Asn Cys Glu Asp ATG TAA CTA ATA ATT CTG TCA ATT ATA TTG GCC TAC TGT GTC ACA GTC AAC TCC CAG GAT 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400 5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100 6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600 6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200 7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300 7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 7700 7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800 7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900 7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000 8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 8100 8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 8200 8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 8300 8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400 8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500 8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600 8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 8700 8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800 8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900 8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000 9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100 9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200 9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290 9300 9310 9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380 9390 9400 9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9490 9500 9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600 9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690 9700 9710 9720 9730 9740 9750 9760 9770 9780 9790 9800 9810 9820 9830 9840 9850 9860 9870 9880 9890 9900 9910 9920 9930 9940 9950 9960 9970 9980 9990 10000 10010 10020 10030 10040 10050 10060 10070 10080 10090 10100 10110 10120 10130 10140 10150 10160 10170 10180 10190 10200 10210 10220 10230 10240 10250 10260 10270 10280 10290 10300 10310 10320 10330 10340 10350 10360 10370 10380 10390 10400 10410 10420 10430 10440 10450 10460 10470 10480 10490 10500 10510 10520 10530 10540 10550 10560 10570 10580 10590 10600 10610 10620 10630 10640 10650 10660 10670 10680 10690 10700 10710 10720 10730 10740 10750 10760 10770 10780 10790 10800 10810 10820 10830 10840 10850 10860 10870 10880 10890 10900 10910 10920 10930 10940 10950 10960 10970 10980 10990 11000 11010 11020 11030 11040 11050 11060 11070 11080 11090 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 1110</pre>			

(57) 要約

本発明は、第1図のアミノ酸配列を有するルシフェラーゼ及びそれをコードする遺伝子を提供するものであり、さらに、本発明は各宿主細胞中で発現可能なプロモーターの下流に前記ルシフェラーゼをコードする遺伝子を連結してなる組換え体ベクターD N A、そのベクターD N Aにより各宿主細胞を形質転換してなる形質転換体、及びそれらの形質転換体を用いたルシフェラーゼの生産方法を提供するものである。

情報としての用途のみ
PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	ES スペイン	MG マダガスカル
AU オーストラリア	FI フィンランド	ML マリー
BB バルバードス	FR フランス	MR モーリタニア
BE ベルギー	GA ガボン	MW マラウイ
BF ブルキナ・ファソ	GB イギリス	NL オランダ
BG ブルガリア	HU ハンガリー	NO ノルウェー
BJ ベナン	IT イタリー	RO ルーマニア
BR ブラジル	JP 日本	SD スーダン
CA カナダ	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SE スウェーデン
CF 中央アフリカ共和国	KR 大韓民国	SN セネガル
CG コンゴー	LI リヒテンシュタイン	SU ソビエト連邦
CH スイス	LK スリランカ	ID チャード
CM カメルーン	LU ルクセンブルグ	TG トーゴ
DE 西ドイツ	MC モナコ	US 米国
DK デンマーク		

明細書

ルシフェラーゼ、それをコードする遺伝子およびルシフェラーゼの生産方法

技術分野

5 本発明は、生物発光反応を用いた分析法に有効な純化された酵素ルシフェラーゼ及びそれをコードする遺伝子に関する。さらに本発明は、前記遺伝子が挿入された新規組換え体ベクターDNA、該ベクターDNAを有する形質転換体、及び該形質転換体を用いたルシフェラーゼ
10 の生産方法を提供する。

背景技術

15 ウミホタル (*Cypridina hilgendorfii*) は、日本沿岸に生息する海産甲殻類で、刺激を受けて海水中に青白い発光液を放出する。発光は基質であるルシフェリンを酵素であるルシフェラーゼにより酸化することによって起こり、ホタルや発光バクテリアの発光のように他の必須成分を必要としない非常に単純な発光系であり、微量分析法への利用が期待される。

20 しかしながら、一般にルシフェリンは化学的に合成することによって大量に得ることができるが、ルシフェラーゼは酵素であるため化学合成ができず、大量に得ることは困難である。ウミホタルのルシフェラーゼの場合も同様で、充分に純化されたルシフェラーゼは得られておらず、海洋汚染の進行でウミホタル自身の採集量が激減したことと相まって、量的な供給が保証されていない。

それ故に、遺伝子組換え技術を利用した該酵素の大量生産法の確立が期待されてきた。

本発明は、高度に純化されたルシフェラーゼの化学合成法、もしくは遺伝子組換え法による合成を可能ならしめ、高純度の該蛋白質を大量に得るために、該蛋白質を特定する遺伝子配列を得、クローニングされた遺伝子配列を動物細胞、酵母、大腸菌等で発現することを可能にし、それらの細胞を用いて、高純度の該酵素を大量に得ることを目的とする。

10

発明の開示

15

本発明は第1図のアミノ酸配列を有するルシフェラーゼ、及びそれをコードする遺伝子、該遺伝子を含んでなる新規組換え体ベクターDNA、及び該ベクターDNAにより宿主細胞を形質転換してなる形質転換体、及び該形質転換体を用いたルシフェラーゼの生産方法である。

図面の簡単な説明

20

第1a図、第1b図、第1c図、第1d図は、ウミホタル由来のルシフェラーゼのcDNAの塩基配列及びアミノ酸配列を示す。各列の上段は、アミノ酸配列を示す。各列の下段はcDNAの塩基配列を示す。

第2図は、ウミホタル由来のルシフェラーゼをコードするcDNAを含む組換え体プラスミドpCLO7の作製法と、その制限酵素地図を示す。

25

第3図は、動物細胞におけるウミホタル由来のルシフェラーゼの発現ベクターpSVLCL5の作製法を示し

たものである。

第4a図は、酵母におけるウミホタル由来のルシフェラーゼの発現ベクターpMFE3A、pMFE3B、pMFE3C、pMFE3Dの制限酵素地図、第4b図
5 は、各々の発現ベクターにおける α フェロモン遺伝子／ルシフェラーゼcDNAの接続部位近傍の塩基配列、及びアミノ酸配列を示したものである。

第5図は、酵母におけるウミホタル由来のルシフェラーゼの発現ベクターpGL1の作製方法を示したものである。
10

第6図は、大腸菌におけるウミホタル由来のルシフェラーゼの発現ベクターpMT-CLP、pMT-CLS、pMT-CLTの作製方法を示したものである。

発明を実施するための最良の形態

15 本発明のルシフェラーゼは、第1図に示される1番目から555番目までの555個のアミノ酸配列からなる蛋白質、または、第1図に示されるアミノ酸配列のうち、29番目のアミノ酸であるプロリンから始まる527個のアミノ酸配列からなる蛋白質、30番目のアミノ酸であるセリンから始まる526個のアミノ酸配列からなる蛋白質、31番目のアミノ酸であるセリンから始まる525個のアミノ酸配列からなる蛋白質、もしくは32番目のスレオニンから始まる524個のアミノ酸配列からなる蛋白質である。さらに、本発明のルシフェラーゼは前記ルシフェラーゼと実質的に同等のルシフェラーゼ活
20
25

性が保持されているならば、前記アミノ酸配列の置換、欠失、挿入等から構成される蛋白質、すなわちルシフェラーゼ同効物も本発明に含まれる。

本発明の遺伝子は、上記ルシフェラーゼをコードする遺伝子であって、第1図の下段にDNA塩基配列で示したものであるが、実質的に同等のルシフェラーゼ活性が保持されているならば、塩基配列の置換、欠失、挿入等から構成される塩基配列も本発明に含まれる。

本発明のルシフェラーゼをコードする遺伝子を得る方法を説明する。まず、ウミホタルをグアニジンチオシアネート中で破碎した破碎液から全RNAを抽出し、オリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィーによりポリA⁺ RNAを精製する。このポリA⁺ RNAを出発材料としてcDNAを合成後、λgt10にクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。

一方、ウミホタルより精製したルシフェラーゼ蛋白質のN末端近傍のアミノ酸配列、及びリジルエンドペプチダーゼ分解によって得られたオリゴペプチドのアミノ酸配列を決定し、それらに対応するスクレオチド配列を有する数種類のオリゴスクレオチドを化学合成し、上述のcDNAライブラリーのスクリーニングのためのプローブとして用いる。

ブラークハイブリダイゼーション法によりこれらのプローブがハイブリッドを形成する組換え体の有する挿入遺伝子の塩基配列の解析を行い、ルシフェラーゼ蛋白質

のアミノ酸配列と一致すれば、ルシフェラーゼ・タンパクをコードする遺伝子の一部であると同定できる。

さらに、本発明は動物細胞、酵母、大腸菌に代表される宿主細胞中で各々発現可能なプロモーターの下流に各々上記D N Aを連結してなる組換えベクターD N A、そのベクターD N Aにより宿主細胞を形質転換してなる形質転換体、及びそれらの形質転換体を用いたルシフェラーゼの生産方法を提供するものである。

具体的には、上述のようにして得られたウミホタル由来のルシフェラーゼをコードするc D N Aを、動物細胞、酵母、大腸菌中において各々安定に保持され、かつそれらの細胞中において発現可能なプロモーターを持つベクターD N Aに連結し、本発明の組換え体ベクターD N Aが得られる。

ここで、プロモーターとは、R N A合成酵素が認識結合してR N A合成を開始するための信号であり、その下流に位置するD N A配列がm R N Aに転写される。したがって、ウミホタル由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子がm R N Aに転写されるためには、各々の細胞中で機能するプロモーターの下流に、ウミホタル由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子が位置する必要がある。

すなわち、ベクターD N Aに含まれるプロモーターの下流の適当な位置にその認識配列の存在する適当な制限酵素によりベクターD N Aを切断し、上記のルシフェラーゼをコードする遺伝子を含むD N Aを連結、挿入した

ものが用いられる。

ここで使用するプロモーターは、各々の宿主細胞中で機能するものなら何でも良く、例えば動物細胞においては動物細胞遺伝子もしくは動物ウイルス遺伝子のプロモーター等があげられる。より具体的には、SV40の後期プロモーター、チミジンキナーゼ遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、サイトメガロウイルス遺伝子のプロモーター等があげられる。酵母においては、酵母遺伝子のプロモーター等が用いられる。例えば、酵母の抑制性酸性フォスファターゼ遺伝子(*PHO5*)、ガラクトース代謝酵素遺伝子(*GAL1*)、 α フェロモン遺伝子(*MF\alpha1*)のプロモーター等が用いられる。大腸菌においては、大腸菌遺伝子、ファージ遺伝子のプロモーター等が用いられる。例えば、大腸菌ラクトース分解酵素の遺伝子(*Iac*)のプロモーター、*t_rp*オペロンに由来するプロモーター、 λ ファージのP_Lプロモーター等があげられる。また、合成*tac*プロモーターなども使用できる。

本発明で用いるベクターDNAは、各々の細胞中で安定に保持され、その細胞中で機能するプロモーターを持つものなら何でも良い。例えば、動物細胞では、プラスミドベクター、ウイルスベクター等があげられるが、より具体的には、pSV2[SV40の初期プロモーターを持つ: J. Mol. Appl. Genet. U.S.A., 1, 327 (1982)]、pSVL(SV40の後期

プロモーターを持つ：ファルマシア社製）、等があげられる。酵母においては、pMF α 8 [αフェロモン遺伝子 (MF α 1) のプロモーターを持つ: Gene, 3, 155 (1985)]、pAM85 [抑制性酸性fos
5 ファターゼ遺伝子 (PHO5) のプロモーターを持つ: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1 (1983)] 等があげられる。大腸菌においては、pMT-1 [trp オペロンのプロモーターを持つ発
10 現ベクター pKM6 (特開昭61-247387号) 由来]、pUC18/pUC19 [Gene, 33, 10
3 (1985)] 等があげられる。

宿主細胞において機能する蛋白質分泌のためのシグナル配列をコードする塩基配列の下流に、ルシフェラーゼをコードするcDNAをつなぐことで、ルシフェラーゼを細胞外に生産させることができる。このシグナル配列に特に制限はなく、動物細胞においては、例えば、インターロイキン-2 (IL-2) のシグナル配列等があげられる。酵母においては、αフェロモンのシグナル配列等があげられる。大腸菌の場合は、β-ラクタマーゼのシグナル配列等があげられる。細胞内に生産させる場合は、シグナル配列を連結する必要はない。

宿主細胞として大腸菌を用い、細胞内にルシフェラーゼを生産させる場合には、発現させたい遺伝子がコードされる領域の5'末端にメチオニンをコードする塩基配列である“ATG”を付加し、大腸菌中で機
25

能するプロモーター及びSD配列の下流に連結する必要がある。ここでいうSD配列とは、リボソームがmRN
A上の同配列を認識、結合して、その下流にある“AT
G”よりタンパク合成を開始するための信号である。ま
た、メチオニンを付加するのは、分泌タンパクをコード
している真核生物の遺伝子の多くは、分泌のためのシグ
ナル配列の下流に本来のタンパクをコードしており、ま
ずシグナル配列を含む形でポリペプチドの前駆体を合成
し、このタンパクが分泌される過程でシグナル配列が切
断除去されるため、最終的に生産されるタンパクのN末
端にはタンパク合成の開始信号として必須であるメチオ
ニンの信号が付いていない場合が多いためである。また、
ウミホタルより精製した天然型のルシフェラーゼがセリ
ン及びスレオニンの2種類のN末端を持つタンパクの混
合物であること、また、多くの真核生物ではシグナル配
列はアラニン-X-アラニン配列の次で切断され、ウミ
ホタル・ルシフェラーゼの塩基配列より予想されるアミ
ノ酸配列中にアラニン-グルタミン酸-アラニン-プロ
リンという配列が存在することから、本発明のベクター
はN末端領域に関して、メチオニンの下流にプロリン、
セリン、またはスレオニンから始まるペプチドをコード
する3種類の発現ベクターが用いられる。

前記各々の組換え体ベクターDNAにより動物細胞、
酵母、大腸菌に代表される宿主細胞を各々形質転換した
形質転換体とは、前記組換え体ベクターDNAを各々の

宿主細胞に導入することによって得られる。

本発明で使用される動物細胞としては特に制限はなく、例えば、COS-1細胞（アフリカミドリザル腎臓由来SV40形質転換細胞）、CHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣由来）等があげられ、好ましくはCOS-1細胞が用いられる。本発明において使用される酵母としては特に制限はなく、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Shizosaccharomyces pombe*、*Pichia pastoris*等があげられる。本発明において使用される大腸菌に特に制限はなく、例えば、HB101、JM109等があげられる。

組換え体ベクターDNAを宿主細胞中に導入する方法に特に制限はないが、例えば、宿主細胞が動物細胞の場合は、DEAE-デキストラン法 [Mol. Cell. Biol. 5, 1188 (1985)]、カルシウム-リン酸共沈法 [Cell 14, 725 (1978)]、電気穿孔法 [EMBO J. 1, 841 (1982)] 等があげられる。中でも、DEAE-デキストラン法が好ましく用いられる。宿主細胞が酵母の場合は、プロトプラス法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1978)] が好ましく用いられる。また、宿主細胞が大腸菌の場合は、好ましくは塩化カルシウム法 [J. Mol. Biol. 53, 154 (1970)] が用いられる。

25 このようにして組換え体ベクターDNAを動物細胞、

酵母、大腸菌に代表される宿主細胞中に各々導入することにより、ウミホタル由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子を含むDNAをベクターDNAに挿入した新規な組換え体ベクターDNA、さらにルシフェラーゼ生産能を有する形質転換体を得ることができる。

上記形質転換体を各々培地に培養し、培養物よりルシフェラーゼを得ることができる。培地としては、各々の培養に用いられるものであれば何でも良く、例えば、動物細胞の場合はダルベッコ変法イーグル培地等があげられ、酵母ではYEPD培地(20g/l トリプトン/10g/l 酵母エキス/20g/ml グルコース)等があげられ、大腸菌ではL培地(10g/l トリプトン/5g/l 酵母エキス/10g/l 塩化ナトリウム)等があげられる。

培養温度は各々の細胞が生育できる温度であれば何度でも良いが、例えば15~45°Cが好ましく、さらに好ましくは動物細胞、大腸菌では25~40°C、より好ましくは30~37°Cである。酵母では15~40°C、より好ましくは20~30°Cである。培養時間にも特に制限はないが、通常1~10日間、好ましくは動物細胞、酵母では3~7日間、大腸菌では1~3日間である。

プロモーターがその発現に適当な誘導を必要とする場合、例えば、動物細胞におけるメタロチオネイン遺伝子のプロモーター、酵母における抑制性酸性フォスファターゼ遺伝子のプロモーター、大腸菌における t_{rp} プロ

口モーター等を用いる場合では適当な誘導物質を加える、
適当な物質を除く、培養温度を変化させる、紫外線等を
照射する等、各々のプロモーターに応じた手段により、
培養中にプロモーターの発現に誘導をかけることができる。
5 具体的には、大腸菌において t_{rp} プロモーター
を使用した場合、 t_{rp} オペロンの誘導物質である I
AA (インドールアクリル酸) を培地に添加することに
より、プロモーターの発現を誘導できる。

この際に、非誘導条件下で產生される微量のタンパク
10 の存在が細胞の増殖等に悪影響を与える場合には、非誘
導下ではプロモーターの発現をできるだけ抑制しておく
ことが好ましい。例えば、非誘導下では完全に発現の抑
制されるプロモーターを用いる、プロモーターの抑制遺
伝子と組み合わせる等があげられる。具体的には例えば、
15 t_{rp} プロモーターの場合、 t_{rp} オペロンの抑制
遺伝子を同一プラスミド上に持つ組換えプラスミドを用
いることが好ましい。この抑制方法としては、トリプト
ファン リプレッサー遺伝子 ($t_{RP}R$) [Nucl -
eic Acids Res., 8, 1552 (198
20 0)] が用いられる。これらとは別に、前述のように、
生産されるタンパクを細胞外に分泌させる方法を用いる
ことも可能である。

25 培養物は、適当な方法、例えば遠心分離等により培養
上清と細胞とに分け、その培養上清もしくは細胞抽出液
中のルシフェラーゼ活性をルミノメーター等を用いて検

5 出する。この培養上清もしくは細胞抽出液はそのままで粗酵素液として使用可能であるが、必要により、例えばF. I. Tsujiiの方法 [Methods in Enzymol., 57, 364 (1978)] 記載の方法により精製して、純化されたルシフェラーゼを得ることができる。

実施例

以下、実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明する。

実施例1

10 cDNAライブラリーの作製

千葉県館山湾内で採集後、凍結保存したウミホタル5gを6Mグアニジンチオシアネート/5mMクエン酸ナトリウム(pH 7.0)/0.5%ザルコシン酸ナトリウム溶液75mlに懸濁し、ポリトロンホモジナイザー(キネマティカ社製)で破碎した。塩化リチウム溶液(アマシャム社製キット)を加え、塩化リチウム共沈法によって約600μgのRNAを得た。このうち300μgのRNAをオリゴ(dT)セルローカラム(コラボレイティブリサーチ社製)クロマトグラフィーによつて精製し、約15μgのpoly(A)⁺RNAを得た。このうち2μgからcDNA合成キット(ライフテクノロジーズ社製)を用いて1μgの2本鎖DNAを得た。このうちの0.15μgをEcoRIメチラーゼで処理してEcoRI切断部位を保護し、T4 DNAリガーゼを用いてEcoRIリンカーを結合した。さら

に、EcoRIで処理し、両末端をEcoRI切断部位に変換した。このDNAをT4 DNAリガーゼを使ってλgt10のEcoRI部位に挿入した後、in vitro パッケージングによりファージパーティクル中に導入した。これを大腸菌NM514に形質導入し、 1×10^6 PFUのcDNAライブラリーを得た。

実施例2

オリゴヌクレオチド・プローブの作製

F. I. Tsujiiの方法 [Methods in Enzymol.、57、364 (1978)] で精製したウミホタル・ルシフェラーゼ $100\text{ }\mu\text{g}$ を凍結乾燥した後、 $100\text{ }\mu\text{l}$ の8M 尿素/ 0.1 M トリス塩酸(pH 7.6)/ 0.14 M 2-メルカプトエタノールに溶解して、 37°C で3時間保温して-SH基をピリジルエチル化した。これに $200\text{ }\mu\text{l}$ の 0.11 M トリス塩酸(pH 9.0)、 $1\text{ }\mu\text{l}$ の2-メチルメルカプトエタノール、 $1\text{ }\mu\text{l}$ の $2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ リジルエンドペプチダーゼ(和光純薬社製)を加えて、 37°C で1時間消化した。これをVYDAC 218 TP54 (C₁₈) (VYD A/C社製)のHPLCにかけ、オリゴペプチドを分離した。得られたオリゴペプチドのうち13個について、アミノ酸シークエンサー470A (アプライドバイオシステムズ社製)を用いてN末端のアミノ酸配列を解析したところ、以下の13個のアミノ酸配列を得た。

14

フラグメント 7 - 1

1

5

10

Thr-Cys-Gly-Ile-Cys-Gly-Asn-Tyr-Asn-Gln

5 フラグメント 7 - 2

1

5

10

Glu-Gly-Glu-Cys-Ile-Asp-Thr-Arg-Cys-Ala-

11 13

10 Thr-Cys-Lys

フラグメント 12 - 1

1

5

10

Cys-Asn-Val-Cys-Tyr-Lys-Pro-Asp-Arg-Ile-

15

11

Ala

フラグメント 12 - 2

20

1

5

7

Val-Ser-His-Arg-Asp-()-Glu

25

15

フラグメント 13

1

5

10

Ala-Arg-Tyr-Gln-Phe-Gln-Gly-Pro-Met-Lys
(Cys)

5

フラグメント 18

1

5

9

Arg-Phe-Asn-Phe-Gln-Glu-Pro-Gly-Lys

10

フラグメント 21

1

5

10

Arg-Asp-Ile-Leu-Ser-Asp-Gly-Leu-Cys-Glu-

15

11

15

Asn-Lys-Pro-Gly-Lys

フラグメント 23

1

5

10

Gly-Gln-Gln-Gly-Phe-Cys-Asp-His-Ala-Trp-

20

11

13

Glu-Phe-Lys

25

16

フラグメント 27

1 5 10
Glu-Phe-Asp-Gly-Cys-Pro-Phe-Tyr-Gly-Asn-
5 11 15 18
Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Tyr-Cys-Lys

フラグメント 38

1 5 10
10 Gly-Gly-Asp-()-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Met-
11 15 17
Glu-Asn-Leu-Asp-Gly-Gln-Lys

15 フラグメント 40

1 5 10
His-Val-Leu-Phe-Asp-Tyr-Val-Glu-Thr-Cys-
20 11 15 20
Ala-Ala-Pro-Glu-Thr-Arg-Gly-Thr-Cys-Val-
25 21 25 30
Leu-Ser-Gly-His-Thr-Phe-Tyr-Asp-Thr-Phe

25

17

フラグメント 47

1

5

10

Glu-Leu-Leu-Met-Ala-Ala-Asp-Cys-Tyr-()-

5

11

15 16

Asn-Thr-()-Asp-Val-Lys

フラグメント 50

1

5

10

10 ()-Leu-Met-Glu-Pro-Tyr-Arg-Ala-Val-Cys-

11

15

20

()-Asn-Asn-Ile-Asn-Phe-Tyr-Tyr-Thr

15 次に上記の 13 種のアミノ酸配列のうち下記の 5 種に対するオリゴヌクレオチドを DNA 合成装置（アプライド バイオシステムズ社製）を用いて作製した。なお塩基配列中の I は、デオキシイノシンを示す。

20

25

18

プローブ I (フラグメント 27 の 1 ~ 6 番のアミノ酸配列に対応)

Glu-Phe-Asp-Gly-Cys-Pro
 GAA TTT GAT GGT TGT CCT
 5 G C C C C C
 A A
 G G

10

3'-CTT AAA CTA CCI ACA GG-5'

C G G G

プローブ II (フラグメント 23 の 6 ~ 10 番のアミノ酸配列に対応)

15 Cys-Asp-His-Ala-Trp
 TGT GAT CAT GCT TGG
 C C C C
 A
 20 G

3'-ACA CTA GTA CGI ACC-5'

G G G

25

プローブIII（フラグメント47の4～9番のアミノ酸配列に対応）

Met-Ala-Ala-Asp-Cys-Tyr

ATG GCT GCT GAT TGT TAT

5

	C	C	C	C	C
	A	A			
	G	G			

10

3'-TAC CGI CGI CTA ACA AT-5'

G	G
---	---

プローブIV（フラグメント50の3～7番のアミノ酸配列に対応）

15

Met-Glu-Pro-Tyr-Arg

ATG GAA CCT TAT CGT

G	C	C	C
A		A	
G		G	

20

AGA

G

25

3'-TAC CTT GGI ATA TC-5'

C	G	G
---	---	---

20

プローブV(フラグメント13の1~10番のアミノ酸配列に対応)

Ala-Arg-Tyr-Gln-Phe-Gln-Gly-Pro-Met-Lys

5	GCT	CGT	TAT	CAA	TTT	CAA	GGT	CCT	ATG	AAA
	C	C	C	G	C	G	C	C		G
	A	A					A	A		
	G	G					G	G		
	AGA									
10	G									

3'-CGI GCI ATA GTT AAA GTT CCI GGI TAC TTT-5'

T	G	C	G	C
---	---	---	---	---

15

以上の5種のオリゴヌクレオチド各々1μgを、10
 μlの50mM トリス塩酸(pH 7.6)/10mM 塩化
 20 マグネシウム/5mM ジチオスレイトール/1mM
 スペルミジン/100mM 塩化カリウムに溶解し、
 5μlの[γ-³²P] ATP (3000Ci/mmol; アマシャム
 社製)、85μlの蒸留水、2μlのT4ポリヌクレ
 オチドキナーゼ(宝酒造社製)を添加して、37°Cで
 25 1時間反応して³²P標識した。

実施例3

プラークハイブリダイゼーション法によるcDNAライ
イブライリーのスクリーニング

実施例1で作製したcDNAライブラリーを用いて、
5 50枚の寒天プレートに1枚当たり約1万個のプラーク
を出現させた。このプラークをナイロン・メンブレンに
移し取り、0.5M 水酸化ナトリウム／1.5M 塩
化ナトリウム溶液中でDNAを変性させた後、0.5M
ト里斯塩酸(pH 7.0)／1.5M 塩化ナトリウム溶液中
10 で中和した。このメンブランを80°Cで2時間保温して、
ファージDNAをメンブラン上に固定した後、50mM
リン酸ナトリウム(pH 7.4)／0.75M 塩化ナトリウ
ム／5×デンハルト溶液(0.1% 牛血清アルブミン
15 ／0.1% フィコール／0.1% ポリビニルピロリ
ドン)／5mM EDTA／0.1% SDS／100
μg/ml 変性サケ精子DNA溶液中で45°Cで2時
間保温してプレハイブリダイゼーションを行った。

次に、新たな同溶液中にメンブランを移し、5 μCi
20 /mlとなるように実施例2で標識したオリゴヌクレオ
チドプローブVを添加して、45°Cで一夜保温してハイ
ブリダイゼーションを行った。約16時間後、6×SSC [90mM クエン酸ナトリウム(pH 7.0)／0.9M
塩化ナトリウム]／0.1% SDSを用いて室温下で
25 30分間ずつ2回、次に45°Cで3.0分間ずつ2回メン
ブランの洗浄を行った。このメンブランを風乾した後、

X-O M A TTM A R フィルム(コダック社製)を用いて、
-70°C、48時間オートラジオグラフィーを行った。

5 フィルムを現像し、32個の陽性クローンを得た。寒天プレート上のこれらの陽性クローンよりファージを増殖させ、ファージDNAを精製した。DNAは-20°Cで保存した。

実施例4

ルシフェラーゼ蛋白質と遺伝子の1次構造の比較

10 実施例3で得られた32個の陽性クローンのうち、最大の約1900塩基対の挿入断片を含むクローンλCL
07より挿入断片を制限酵素EcoRIで切り出し、プラスマドpUC18にサブクローニングし、組換え体プラスマドpCL07を作製した(第2図)。この1.9
15 kbのEcoRI断片の塩基配列の決定は、通常のジデオキシ法を用いて行った。決定された塩基配列を第1図に示す。

得られた遺伝子の情報と、実施例2で得られた蛋白質の情報を比較することにより、第1表に示すように蛋白質と遺伝子の1次構造を対応させることができた。その結果、第1図に示すようにウミホタル由来のルシフェラーゼの遺伝子の塩基配列が特定され、また該蛋白質のアミノ酸配列を規定することができた。

第1表. アミノ酸配列と遺伝子の1次構造との対応(その1)

	アミノ酸配列の解析の結果	遺伝子1次構造との対応
	フラグメント7-1 Thr-Cys-Gly-Ile-Cys-Gly-Asn-Tyr-Asn-Gln	Thr-Cys-Gly-Ile-Cys-Gly-Asn-Tyr-Asn-Gln ACA TGC GGC ATA TGT GGT AAC TAT AAT CAA
5	フラグメント7-2 Glu-Gly-Glu-Cys-Ile-Asp-Thr-Arg-Cys-Ala-	Glu-Gly-Glu-Cys-Ile-Asp-Thr-Arg-Cys-Ala- GAA GGA GAA TGT ATC GAT ACC AGA TGC GCA
	Thr-Cys-Lys	Thr-Cys-Lys ACA TGT AAA
	フラグメント12-1 Cys-Asn-Val-Cys-Tyr-Lys-Pro-Asp-Arg-Ile-	Cys-Asn-Val-Cys-Tyr-Lys-Pro-Asp-Arg-Ile- TGT AAT GTC TGC TAC AAG CCT GAC CGT AIT
10	Ala	Ala GCA
	フラグメント12-2 Val-Ser-His-Arg-Asp-()-Glu	Val-Ser-His-Arg-Asp-()-Glu GTT TCA CAT AGA GAT GTT GAG
15	フラグメント13 Ala-Arg-Tyr-Gln-Phe-Gln-Gly-Pro-Met-Lys (Cys)	Ala-Arg-Tyr-Gln-Phe-Gln-Gly-Pro-Met-Lys (Cys) GCC AGA TAT CAA TTC CAG GGC CCA TGC AAA
	フラグメント18 Arg-Phe-Asn-Phe-Gln-Glu-Pro-Gly-Lys	Arg-Phe-Asn-Phe-Gln-Glu-Pro-Gly-Lys AGA TTT AAT TTT CAG GAA CCT GGT AAA
20	フラグメント21 Arg-Asp-Ile-Leu-Ser-Asp-Gly-Leu-Cys-Glu-	Arg-Asp-Ile-Leu-Ser-Asp-Gly-Leu-Cys-Glu- CGA GAC ATA CTA TCA GAC GGA CTG TGT GAA
	Asn-Lys-Pro-Gly-Lys	Asn-Lys-Pro-Gly-Lys AAT AAA CCA CGG AAG
	フラグメント23 Gly-Gln-Gln-Gly-Phe-Cys-Asp-His-Ala-Trp-	Gly-Gln-Gln-Gly-Phe-Cys-Asp-His-Ala-Trp- GGA CAG CAA GGA TTC TGT GAC CAT GCT TGG
25	Glu-Phe-Lys	Glu-Phe-Lys GAG TTC AAA

第1表. アミノ酸配列と遺伝子の1次構造との対応（その2）

	アミノ酸配列の解析の結果	遺伝子1次構造との対応
5	フラグメント27 Glu-Phe-Asp-Gly-Cys-Pro-Phe-Tyr-Gly-Asn-	Glu-Phe-Asp-Gly-Cys-Pro-Phe-Tyr-Gly-Asn- GAG TTC GAC GGC TGC CCA TTC TAC GGG AAT
	Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Tyr-Cys-Lys	Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Tyr-Cys-Lys CCT TCT GAT ATC GAA TAC TGC AAA
10	フラグメント38 Gly-Gly-Asp-()-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Met-	Gly-Gly-Asp-()-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Met- GGT GGC GAC TGG TCT GTA ACC CTC ACC ATG
	Glu-Asn-Leu-Asp-Gly-Gln-Lys	Glu-Asn-Leu-Asp-Gly-Gln-Lys GAG AAT CTA GAT GGA CAG AAG
15	フラグメント40 His-Val-Leu-Phe-Asp-Tyr-Val-Glu-Thr-Cys-	His-Val-Leu-Phe-Asp-Tyr-Val-Glu-Thr-Cys- CAC GTC CTT TTC GAC TAT GTT GAG ACA TGC
	Ala-Ala-Pro-Glu-Thr-Arg-Gly-Thr-Cys-Val-	Ala-Ala-Pro-Glu-Thr-Arg-Gly-Thr-Cys-Val- GCT GCA CCG GAA ACG AGA GGA ACG TGT GTT
	Leu-Ser-Gly-His-Thr-Phe-Tyr-Asp-Thr-Phe	Leu-Ser-Gly-His-Thr-Phe-Tyr-Asp-Thr-Phe TTA TCA GGA CAT ACT TTC TAT GAC ACA TTC
20	フラグメント47 Glu-Leu-Leu-Met-Ala-Ala-Asp-Cys-Tyr-()-	Glu-Leu-Leu-Met-Ala-Ala-Asp-Cys-Tyr-()- GAG CTT CTG ATG GCC GCA GAC TGT TAC TGG
	Asn-Thr-()-Asp-Val-Lys	Asn-Thr-()-Asp-Val-Lys AAC ACA TGG GAT GTA AAG
	フラグメント50 ()-Leu-Met-Glu-Pro-Tyr-Arg-Ala-Val-Cys-	()-Leu-Met-Glu-Pro-Tyr-Arg-Ala-Val-Cys- GGT CTC ATG GAG CCA TAC AGA GCT GTA TGT
25	()-Asn-Asn-Ile-Asn-Phe-Tyr-Tyr-Tyr-Thr	()-Asn-Asn-Ile-Asn-Phe-Tyr-Tyr-Tyr-Thr CGT AAC AAT ATC AAC TTC TAC TAT TAC ACT

実施例5

SV40後期プロモーターを有する発現ベクターpSVLへのルシフェラーゼcDNAの挿入

実施例4で得られたウミホタル由来のルシフェラーゼをコードする前記の1. 9 kbのEcoRI断片1 μgに各々1. 5 mMのdATP, dTTP, dCTP及びdTTPの存在下に、5ユニットの大腸菌DNAポリメラーゼI ラージ フラグメント（宝酒造社製）を作用させ、末端を修復した。また、ベクターのpSVL(SV40後期プロモーターを持つ発現ベクター：ファルマシア社製)は、制限酵素SmaIにより分解した。

ついで末端を修復した1. 9 kb断片(0. 3 μg)とpSVLのSmaI分解物(0. 1 μg)とをT4DNAリガーゼによって結合し、その反応液を用いて大腸菌HB101コンピテント細胞（宝酒造社製）の形質転換を行い、この1. 9 kb断片の組み込まれた組換え体プラスミドを得、pSVLCL5と命名した（第3図）。

実施例6

COS-1細胞によるウミホタル由来のルシフェラーゼの生産

実施例5において作製した発現ベクターpSVLCL5(10 μg)を、COS-1細胞にDEAE-デキストラン法[Mol. Cell. Biol. 5, 1188(1985)]を用いて導入した。また、コントロー

ルとしてpSVL ($10 \mu\text{g}$) を同様にしてCOS-1細胞に導入した。

これらの細胞を 25 cm^2 の培養フラスコ中で、10% 牛胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地（日本製薬社製） 10 ml を用いて5% CO_2 の存在下、
5 37°C で5日間培養した。培養途中及び培養終了後、培養液 1 ml を採取し、 $3,000 \text{ rpm}$ 、10分間、 4°C で遠心して、その上清を集め、培養上清とした。

また、培養終了後、細胞はトリプシン処理によって培養フラスコからはがした後、 1 ml のPBS (-)（日本製薬社製）で洗浄し、 $3,000 \text{ rpm}$ 、10分間、 4°C で遠心し上清を捨てた。これをさらに2回繰り返し、 $200 \mu\text{l}$ のPBS (-) に懸濁した。凍結融解を3回繰り返し、細胞抽出液とした。
10

15 実施例7

動物細胞により生産されたルシフェラーゼの活性測定

実施例6に示した培養上清中のルシフェラーゼ活性の測定は、下記の方法によって行い、その結果を第2表に示した。すなわち、 $30 \mu\text{l}$ の培養上清に $270 \mu\text{l}$ の測定用緩衝液 [100 mM リン酸ナトリウム(pH 7.0) / 200 mM 塩化ナトリウム] を混合した。 $2 \mu\text{l}$ の
20 $33 \mu\text{M}$ ウミホタル・ルシフェリンを混合し、発生するフォトン数を直ちにルミノメーター (Lumac L 2010) を用いて30秒間計測した。発光強度は1秒当たりの平均フォトン数として示した。コントロールと
25

して pSVL を導入した COS - 1 細胞の培養上清についても同様にして発生するフォトン数を計測した。

実施例 6 に示した細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性は、下記に記載した方法により行い、その結果も第 2 表に示した。すなわち実施例 6 で作製した細胞画分の 10 μ l を 290 μ l の上記測定用緩衝液と混合し、さらに 2 μ l の 33 μ M ウミホタル・ルシフェリンを混合し、培養上清の場合と同様にしてルシフェラーゼ活性を測定した。

10

第2表

15	プラスミド	ルシフェラーゼ活性 ($\times 10^5$ cps/ml)					
		細胞外					細胞内
		24時間	48時間	72時間	96時間	120時間	
	(a) pSVLCL5 (No. 1)	2.2	4.0	4.3	4.6	5.2	1.2
	(b) pSVLCL5 (No. 2)	2.3	5.8	8.3	9.0	10.5	3.0
	(c) pSVLCL5 (No. 3)	2.1	3.1	3.8	4.1	5.5	0.8
20	(d) pSVLCL5 (No. 4)	2.3	4.0	5.5	5.7	6.7	1.4
	(e) pSVL (コントロール)	2.0	2.5	2.3	2.3	2.1	0.2

25

実施例 8

酵母発現ベクター用オリゴヌクレオチドの合成とアニーリング

(1) ウミホタルより精製した天然型のルシフェラーゼが、第1図に示したアミノ酸配列の第31番目のアミノ酸であるセリンと第32番目のアミノ酸であるスレオニンのN末端を持つ2種類のペプチドの混合物であること、(2)cDNAより推定されるルシフェラーゼのアミノ酸配列のN末端に、タンパクの分泌のためのシグナル配列の特徴を持つアミノ酸配列が存在すること、

(3)多くの真核生物ではシグナル配列はアラニン-X-アラニン配列の次で切断されるが、ウミホタルのルシフェラーゼにおいてもアラニン-グルタミン酸-アラニン-プロリンの配列が存在すること等の理由により、第1図に示したウミホタル由来のルシフェラーゼのアミノ酸配列中の第29番目のアミノ酸であるプロリン(Y P型)、第30番目のアミノ酸であるセリン(Y N型)、第31番目のアミノ酸であるセリン(Y S型)、第32番目のアミノ酸であるスレオニン(Y T型)から始まるルシフェラーゼ・タンパクを作製し、酵母の α フェロモンのシグナル配列の下流に連結するために、以下の10本のオリゴヌクレオチドを合成した。

	Y P - 1	5'-CCTTCAAGTACTCCA-3'
	Y P - 2	5'-CTGTTGGAGTACTTGAAGG-3'
	Y S - 1	5'-AGTACACCA-3'
	Y S - 2	5'-CTGTTGGTGTACT-3'
5	Y T - 1	5'-ACTCCA-3'
	Y T - 2	5'-CTGTTGGAGT-3'
	Y N - 1	5'-TCGTCGACACCA-3'
	Y N - 2	5'-CTGTTGGTGTGACGA-3'
	U - 1	5'-ACAGTCCCAACATCTTGTGAAGCTAAAGAAGGAG AATGTAT-3'
10	U - 2	5'-CGATACATTCTCCTTCTTAGCTTCACAAGATGT TGGGA-3'

15 合成オリゴヌクレオチド Y P - 2、 Y S - 2、 Y T -
2、 Y N - 2、 U - 2 の 5 本について、 5' 末端を T
4 DNA キナーゼによってリン酸化した。すなわち、
各オリゴヌクレオチド 300 pmol を各々 20 μl の
反応液 [50 mM トリス塩酸 (pH 7.6) / 10 mM
20 塩化マグネシウム / 0.1 mM スペルミジン / 5 mM
ジチオスレイトール / 0.1 mM EDTA] 中で T4
DNA キナーゼ (宝酒造社製) 10 ユニットを用いて、
37 °C で 1 時間反応させ、 70 °C で 5 分間加熱した後、
- 20 °C で保存した。

25 各オリゴヌクレオチドのアニーリングは次のように行

った。YP型ではYP-1、リン酸化したYP-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、YS型にはYS-1、リン酸化したYS-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、YT型にはYT-1、リン酸化したYT-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、YN型にはYN-1、リン酸化したYN-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、各々50 pmolずつ混合し、70°Cで5分間加熱後、インキュベーターの電源を切り42°Cになるまで放置した。

10 実施例9

酵母αフェロモン遺伝子のプロモーターを有する発現ベクターpMFα8へのルシフェラーゼcDNAの挿入

ウミホタル・ルシフェラーゼcDNA中に存在する制限酵素C_IaI切断部位に実施例8に示した合成オリゴマーを組み込み、5'末端にStuI部位を持ち、N末端28、29、30、31個のアミノ酸を削ったルシフェラーゼcDNAを作製した。

酵母の発現ベクターpMFα8 [Gene, 3, 155 (1985) : ATCC 37418]は、αフェロモン遺伝子のリーダー配列をコードする領域の直後を制限酵素StuIで切断し、上述のルシフェラーゼcDNAを挿入した。作製した発現ベクターは、各々pMEF3A (YP型)、pMEF3B (YS型)、pMEF3C (YT型)、pMEF3D (YN型)と命名した(第25 4a図)。

作製した各々の発現ベクターの α フェロモン遺伝子／ルシフェラーゼcDNAの接続部位近傍の塩基配列は、ルシフェラーゼcDNA内の配列である5' - T A T A A A T G G T C C A A G G A - 3' をプライマーとして、通常のジデオキシ法によって、正しく挿入されていることを確認した。pMFE3A、pMFE3B、pMFE3C、及びpMFE3Dにおける α フェロモン遺伝子／ルシフェラーゼcDNAの接続部位近傍の塩基配列、及びアミノ酸配列は第4b図に示した。

10 実施例10

酵母GAL1遺伝子のプロモーターを有する発現ベクターp103へのルシフェラーゼcDNAの挿入

実施例3で得たpCL07より、1. 3kb、0. 6kbの2つのEcoRI断片を各々プラスミドpUC18にサブクローニングし、プラスミドpCL0712、pCL0742を作製した。pCL07(1 μ g)、及びpCL0712(1 μ g)をHindIIIとBglIIで切斷し、pCL07よりルシフェラーゼのN末端を含むDNA断片を、pCL0712よりルシフェラーゼのC末端を含むDNA断片を精製した。この2断片をプラスミドpSPT18(ベーリンガー・マンハイム社製)のHindIII部位にサブクローニングし、得られた組換え体プラスミドをpSTCL81と命名した。

次に、このpSTCL81(1 μ g)をBamHIで切斷し、クローニングした全cDNA配列をBamHI

断片として回収した。

一方、酵母の *GAL1* プロモーターを持つ発現ベクター
— p103 [*Saccharomyces cerevisiae* の *GAL1* プロ
モーター { Mol. Cell. Biol. 4, 144
5 0 (1984) } の下流に、 *Bam*H I 切断部位を含む
ポリリンカーを持つ：大阪大学・原島 俊 助教授より
供与された] 約 0.1 μ g を *Bam*H I で切断し、 T 4
10 DNA リガーゼを用いて前記の cDNA 断片約 0.1
 μ g と連結し、 *GAL1* プロモーターの下流にルシフェ
ラーゼ cDNA の挿入された発現ベクター pGL1 を作
製した（第 5 図）。

実施例 11

酵母によるウミホタル由来のルシフェラーゼの生産

実施例 9において作製した発現ベクター pMFE3A、
15 pMFE3B、 pMFE3C、 pMFE3D 各々 10 μ
g をプロトプラスト法 [Proc. Natl. Acad.
Sci. USA, 75, 1929 (1978)] によつ
て酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 20B-12 株 [Gene,
20 37, 155 (1985)] 株に導入した。

これらの形質転換体を 1 l の培養フラスコ中で 100
ml の YEPD 培地を用いて 30 °C で 3 日間培養した。
培養途中及び培養終了後、培養液 5 ml を採取し、 4 °C、
10 分間、 3,000 r.p.m で遠心して、その上清を集め
培養上清とした。

25 また培養液 1 ml 分の菌体は 5 ml の滅菌蒸留水で洗

5 淨後、1 mlの50 mM リン酸ナトリウム(pH 7.5)／
0.1% Triton X-100に懸濁した。1 ml
のガラス・ビーズ(直径0.45 mm)懸濁液を加え、
0°Cで、時々ミキサーで激しく攪拌しながら5分間放置
した。軽く遠心してガラス・ビーズを分離し、上清はさ
らに1.5 mlのエッペンドルフ チューブに移し、5
分間、15,000 rpmで遠心した。この上清を菌体
抽出液とした。

実施例12

10 酵母によるウミホタル由来のルシフェラーゼの生産
実施例10で作製した発現ベクターpGL1(10 μ
g)は、実施例11と同様にプロトプラスト法によって
酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YSH2676株((a) ura3-52
leu2-3 leu2-112 trp1 pho3 pho5 his1-29)株に導入し
15 た。

この形質転換体を1 lの培養フラスコ中で100 ml
の培地(1% 酵母エキス／2% ペプトン／2% ガ
ラクトース)を用いて30°Cで2日間培養した。培養途
中及び培養終了後、培養液5 mlを3,000 rpm、
20 10分間、4°Cで遠心して、その上清を集め、培養上清
とした。

また、菌体抽出液も実施例11と同様にして調製した。

実施例13

酵母により生産されたルシフェラーゼの活性測定

25 実施例11に示した培養上清中のルシフェラーゼ活性

の測定は、実施例7に記載した動物細胞の培養上清のルシフェラーゼ活性の測定と同様にして行い、その結果を第3表に示した。コントロールとして、pMF α 8を導入したS. cerevisiae 20B-12株の培養上清についても同様にして発生するフォトン数を計測した。

実施例11に示した酵母細胞中のルシフェラーゼ活性は、下記に記載した方法により行い、その結果も第3表に示した。すなわち、実施例11で作製した細胞抽出液10 μ lを290 μ lの上記測定用緩衝液と混合し、さらに2 μ lの33 μ M ウミホタル・ルシフェリンを混合し、培養上清の場合と同様にしてルシフェラーゼ活性を測定した。

第3表

15	プラスミド	ルシフェラーゼ活性 ($\times 10^5$ cps/ml)				
		12時間	21時間	38時間	47時間	64時間
(a) pMFE3A	菌体内	<0.01	<0.01	0.01	0.02	0.01
	菌体外	0.05	0.02	4.84	13.47	2.11
(b) pMFE3B	菌体内	<0.01	<0.01	0.02	0.01	<0.01
	菌体外	0.06	0.20	6.22	2.73	1.02
(c) pMFE3C	菌体内	<0.01	<0.01	0.02	0.01	0.01
	菌体外	0.10	0.21	2.76	0.79	0.89
(d) pMFE3D	菌体内	<0.01	<0.01	0.02	0.01	0.01
	菌体外	0.06	0.21	3.97	0.76	1.02
(e) control	菌体内	<0.01	<0.01	<0.01	0.01	<0.01
	菌体外	0.06	0.04	0.05	0.06	0.11

実施例 14

酵母により生産されたルシフェラーゼの活性測定

実施例 12 に示した培養上清中のルシフェラーゼ活性の測定は、実施例 7 に記載した動物細胞の培養上清のルシフェラーゼ活性の測定と同様にして行い、その結果を 5 第 4 表に示した。コントロールとして、p103 を導入した *S. cerevisiae* YSH2676 株の培養上清についても同様にして発生するフォトン数を計測した。

実施例 12 に示した酵母細胞中のルシフェラーゼ活性 10 は、実施例 13 と同様にして行い、その結果を第 4 表に示した。

第 4 表

	クローン N o.	ルシフェラーゼ活性 ($\times 10^5$ c p s / ml)			
		20時間	43時間	51時間	
15	(a) N o. 1	菌体内 菌体外	0.06 0.53	0.07 7.28	0.07 7.71
	(b) N o. 2	菌体内 菌体外	0.04 0.44	0.06 3.04	0.07 3.49
20	(c) N o. 3	菌体内 菌体外	0.07 0.40	0.07 3.00	0.06 4.70
	(d) N o. 4	菌体内 菌体外	0.05 0.92	0.10 5.89	0.09 6.27
	(e) N o. 5	菌体内 菌体外	0.06 0.50	0.08 2.52	0.05 2.47
	(f) control	菌体内 菌体外	0.01 0.08	n.t. 0.13	n.t. 0.03

実施例 15

大腸菌発現ベクター用オリゴヌクレオチドの合成とア
ニーリング

5 大腸菌トリプトファン合成遺伝子(*t r p*)オペロンのプロモーターとSD配列の下流にメチオニン-プロリ
ン(EP型)、メチオニン-セリン(ES型)、メチオ
ニン-スレオニン(ET型)で開始される該ルシフェラ
ーゼの発現ベクターを作製するために、以下の6本のオ
リゴヌクレオチドを合成した。

10

- EP - 1 5'-CGATGCCGTCAAGTACACCA-3'
- EP - 2 5'-CTGTTGGTGTACTTGACGGCAT-3'
- ES - 1 5'-CGATGAGTACACCA-3'
- ES - 2 5'-CTGTTGGTGTACTCAT-3'
- 15 ET - 1 5'-CGATGACACCA-3'
- ET - 2 5'-CTGTTGGTGTTCAT-3'

20 合成オリゴヌクレオチドEP-2、ES-2、ET-
2、及び実施例8のU-2の各々300 pmolは、実
施例8と同様にしてN末端をT4 DNAキナーゼを
用いてリン酸化し、-20°Cで保存した。

各オリゴヌクレオチドは、EP型ではEP-1、リン
酸化したEP-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、
ES型にはES-1、リン酸化したES-2、U-1、
25 及びリン酸化したU-2を、ET型にはET-1、リン

酸化したE T - 2、U - 1、及びリン酸化したU - 2を各々50 pmolずつ混合し、実施例8と同様にしてアニーリングした。

実施例16

5 大腸菌trpプロモーターを有する発現ベクターpMT1へのルシフェラーゼcDNAの挿入

大腸菌トリプトファンオペロン(*trp*)のプロモーター及びSD配列を持つ発現ベクターpMT-1 [PKM6(特開昭61-247387号)由来]は、制限酵素*Sma*I、*Cla*Iと*Pvu*IIで切斷した。

一方、実施例3で作製した発現ベクターpCL07を*Sma*Iと*Cla*Iで切斷し、*Cla*Iより下流のルシフェラーゼcDNAを含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動法により分離、精製した。

15 pMT-1の切斷断片とpCL07の精製断片の各々0.1 μgをT4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)を用いて連結し、再び制限酵素*Sma*Iで切斷した後、市販の大腸菌HB101コンピテント細胞(宝酒造社製)を形質転換し、プラスミドpMT-CL07を作製した。このプラスミドは、*trp*プロモーター／SD配列の下流に*Cla*I部位より下流のルシフェラーゼcDNAを持つ。

20 このpMT-CL07を制限酵素*Cla*Iで切斷し、その0.1 μgと実施例15で作製した合成DNAの5 μlとをT4 DNAリガーゼで連結し、*trp*プロ

ロモーター／SD配列の下流に、メチオニン-プロリン（EP型）、メチオニン-セリン（ES型）、メチオニン-スレオニン（ET型）で開始される該ルシフェラーゼ遺伝子を持つ発現ベクターを作製した。作製したプラスミドは各々、pMT-CLP、pMT-CLS、及びpMT-CLTと命名した。

作製した各々の発現ベクターのSD配列／ルシフェラーゼの接続部位近傍の塩基配列は、ルシフェラーゼcDNA内の配列である5' - T A T A A A T G G T C C A A G G A - 3' をプライマーとして、通常のジデオキシ法によって、正しく挿入されていることを確認した。

pMT-CLP、pMT-CLS、pMT-CLTの制限酵素地図と確認した塩基配列を第6図に示す。

実施例17

15 大腸菌によるウミホタル由来のルシフェラーゼの生産
実施例16で作製した発現ベクターを用いて大腸菌HB101株を形質転換し、得られた形質転換体を5mlのL培地（アンピシリン：100mg/lを含む）で1晩、37°Cで静置培養した。翌日培養液の1mlを採取し、50mlの合成培地[2×M9-カザミノ酸培地
(6g/l リン酸二水素カリウム/12g/l リン酸水素二ナトリウム/10g/l カザミノ酸/10g/l 塩化ナトリウム/1g/l 塩化アンモニウム/)
/1mg/l 塩酸チアミン/250mg/l 硫酸マグネシウム/1% グルコース/100mg/l アン

ピシリン]に懸濁し、25°Cで1晩振盪培養した。翌朝、培養液にIAA(最終濃度20mg/l)とグルコース(最終濃度1%)を加え、12.5%のアンモニア水でpHを7.5に調整して、25°Cで3時間培養を続けた。

5 3時間後、IAA、グルコース、アンモニア水を同様にして加え、さらに3時間培養を続けた。培養終了後、培養液8mlを遠心して集菌し、菌体を0.5mlのTE緩衝液[10mMトリス塩酸(pH 8.0)/1mM EDTA]に懸濁した。42°Cの温水とドライアイス・アセトン液を用いて凍結融解を3回繰り返して溶菌後、10分間、10,000rpmで遠心し、その遠心上清を粗酵素液とした。

実施例18

大腸菌により生産されたルシフェラーゼの活性測定

15 実施例17で作製した粗酵素液中のルシフェラーゼ活性の測定は、下記に記載した方法によって行い、その結果を第5表に示した。すなわち、150μlの粗酵素液に150μlの前記測定用緩衝液、2μlの33μMウミホタル・ルシフェリンを混合し、発生するフォトン数を30秒間計測し、その結果を第5表に示した。コントロールとしてpMT-CLR(合成DNAが逆方向に挿入されたプラスミド)を導入した大腸菌HB101についても同様にして発生するフォトン数を計測した。

第5表

	プラスミド	ルシフェラーゼ活性 (c p s)
5	(a) pMT-CLP	1200
	(b) pMT-CLS	870
	(c) pMT-CLT	540
	(d) pMT-CLR (control)	200

産業上の利用可能性

ウミホタル由来のルシフェラーゼは非常に発光強度の
15 強い発光系であり、抗体分子を本酵素と結合させて E I
A (酵素抗体アッセイ法)に、また、DNA/RNA 分子と本酵素とを結合させて DNA プローブ法に利用する
など、各種検査法への利用が期待できる。

本発明によって、ウミホタル由来のルシフェラーゼを
20 コードする cDNA の 1 次構造が特定され、同時に該ル
シフェラーゼの 1 次構造が明らかになった。さらに、本
発明にあるルシフェラーゼの発現ベクターを持つ動物細
胞、酵母、大腸菌の大量培養により、該ルシフェラーゼ
を安定的に生産させる方法が開かれ、該ルシフェラーゼ
25 を安価で大量に得ることができるようになるものと期待

41

される。

また、プロテイン・エンジニアリングの手法を用いて、該ルシフェラーゼの安定性の増加、発光量子収率の改善、発光条件の改善、発光波長の変更等を行う方法が開かれ

た。

10

15

20

25

請求の範囲

- (1) 第1図に示す1番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- 5 (2) 第1図に示す29番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- 10 (3) 第1図に示す30番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- (4) 第1図に示す31番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- 15 (5) 第1図に示す32番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- (6) 請求の範囲第1～5項記載のルシフェラーゼまたはその同効物をコードする遺伝子。
- 20 (7) 第1図に示す塩基配列である請求の範囲第6項記載の遺伝子。
- (8) 宿主細胞中で発現可能なプロモーターの下流に請求の範囲第6項記載の遺伝子を連結してなる組換え体ベクターD N A。
- 25 (9) 大腸菌中で発現可能なプロモーター及びS D配列の下流に請求の範囲第6項記載の遺伝子を連結して

43

なる組換え体ベクターD N A。

(1 0) 請求の範囲第 8 または 9 項記載のベクターD N Aにより宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

5 (1 1) 宿主細胞が動物細胞、酵母及び大腸菌からなる群から選ばれた 1 種である請求の範囲第 1 0 項記載の形質転換体。

(1 2) 請求の範囲第 1 0 または 1 1 項記載の形質転換体を培養することを特徴とするルシフェラーゼの生

10 産方法。

15

20

25

1 / 9

第1a図

10 20 30 40 50 60

Met Lys Leu Ile Ile Leu Ser Ile Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Val Asn Cys Gln Asp
ATG AAG CTA ATA ATT CTG TCT ATT ATA TTG GCC TAC TGT GTC ACA GTC AAC TGC CAG GAT

30	40				
Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Ala Pro Ser Ser Thr Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu	GCA TGT CCT GTA GAA GCT GAA GCA CCG TCA AGT ACA CCA ACA GTC CCA ACA TCT TGT GAA				
70	80	90	100	110	120

50		60			
Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys Arg Asp Ile Leu Ser					
GCT AAA GAA GGA GAA TGT ATC GAT ACC AGA TGC GCA ACA TGT AAA CGA GAC ATA CTA TCA					
130	140	150	160	170	180

Asp Gly Leu Cys Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile	70	80			
GAC GGA CTG TGT GAA AAT AAA CCA GGG AAG ACA TGC TGT AGA ATG TGC CAG TAT GTA ATT					
190	200	210	220	230	240

90	100				
Glu Cys Arg Val Glu Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys Arg Phe Asn Phe					
GAA TGC AGA GTA GAA GCT GCT GGA TAT TTT AGA ACG TTT TAC GGC AAA AGA TTT AAT TTT					
250	260	270	280	290	300

2 / 9

第1b図

170	180
Gly Ala Asp Pro Val Ile Ala Asn Pro Phe Thr Ile Gly Glu Val Thr Ile Ala Val Val	GGA GCT GAC CCA GTT ATC GCT AAC CCG TTC ACA ATT GGT GAG GTG ACC ATT GCT GTT GTC
490	500
510	520
530	540

	190		200		
Glu Ile Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe Phe Lys Leu Ile Val Ile Asp Ile					
GAA ATA CCC GGC TTC AAT ATT ACA GTC ATC GAA TTC TTT AAA CTA ATC GTG AIT GAT ATT					
550	560	570	580	590	600

	210		220		
Leu Gly Gly Arg Ser Val Arg Ile Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly Leu Ile Ser Gly					
CTG GGA GGA AGA TCT GTG AGA ATT GCT CCA GAC ACA GCA AAC AAA GGA CTG ATA TCT GGT					
610	620	630	640	650	660

		230			240
Ile Cys Gly Asn Leu Glu Met Asn Asp Ala Asp Asp Phe Thr Thr Asp Ala Asp Gln Leu	ATC TGT GGT AAT CTG GAG ATG AAT GAC GCT GAT GAC TTT ACT ACA GAC GCA GAT CAG CTG				
670	680	690	700	710	720

	250		260		
Ala Ile Gln Pro Asn Ile Asn Lys Glu Phe Asp Gly Cys Pro Phe Tyr Gly Asn Pro Ser					
GCG ATC CAA CCC AAC ATA AAC AAA GAG TTC GAC GGC TGC CCA TTC TAC GGG AAT CCT TCT					
730	740	750	760	770	780

Asp Ile Glu Tyr Cys Lys Gly Leu Met Glu Pro Tyr Arg Ala Val Cys Arg Asn Asn Ile	270	280			
GAT ATC GAA TAC TGC AAA GGT CTC ATG GAG CCA TAC AGA GCT GTA TGT CGT AAC AAT ATC					
790	800	810	820	830	840

310	320
Ala Lys His Val Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr	GCT AAA CAC GTC CTT TTC GAC TAT GTT GAG ACA TGC GCT GCA CCG GAA ACG AGA GGA ACG
910	920
930	940
950	960

3 / 9

第1 C 図

330 340

Cys Val Leu Ser Gly His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg Tyr Gln Phe Gln
TGT GTT TTA TCA GGA CAT ACT TTC TAT GAC ACA TTC GAC AAA GCC AGA TAT CAA TTC CAG
970 980 990 1000 1010 1020

350 360

Gly Pro Cys Lys Glu Leu Leu Met Ala Ala Asp Cys Tyr Trp Asn Thr Trp Asp Val Lys
GGC CCA TGC AAA GAG CTT CTG ATG GCC GCA GAC TGT TAC TGG AAC ACA TGG GAT GTA AAG
1030 1040 1050 1060 1070 1080

370 380

Val Ser His Arg Asp Val Glu Ser Tyr Thr Glu Val Glu Lys Val Thr Ile Arg Lys Gln
GTT TCA CAT AGA GAT GTT GAG TCA TAC ACT GAG GTA GAG AAA GTA ACA ATC AGG AAA CAG
1090 1100 1110 1120 1130 1140

390 400

Ser Thr Val Val Asp Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Val Lys Val Gly Val Asp Val
TCA ACT GTA GTA GAT TTG ATT GTG GAT GGC AAG CAG GTC AAG GTT GGA GGA GTG GAT GTA
1150 1160 1170 1180 1190 1200

410 420

Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Gln Asp Gly Asp Ile Leu Thr
TCT ATC CCG TAC AGT TCT GAG AAC ACA TCC ATA TAC TGG CAG GAT GGA GAC ATC CTG ACG
1210 1220 1230 1240 1250 1260

430 440

Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val
ACG GCC ATC CTA CCT GAA GCT CTT GTC GTT AAG TTC AAC TTT AAG CAG CTC CTT GTA GTT
1270 1280 1290 1300 1310 1320

450 460

His Ile Arg Asp Pro Phe Asp Gly Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp
CAT ATC AGA GAT CCA TTC GAT GGA AAG ACA TGC GGC ATA TGT GGT AAC TAT AAT CAA GAT
1330 1340 1350 1360 1370 1380

470 480

Ser Thr Asp Asp Phe Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Ala Leu Thr Pro Asn Pro Pro Gly
TCA ACT GAT GAT TTC TTT GAC GCA GAA GGA GCA TGC GCT CTG ACC CCC AAT CCC CCA GGA
1390 1400 1410 1420 1430 1440

4 / 9

第1 d図

490 500
 Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Ser Leu Phe Asp Ser Ser
 TGT ACA GAG GAG CAG AAA CCA GAA GCT GAG CGA CTC TGC AAT AGT CTA TTT GAT AGT TCT
 1450 1460 1470 1480 1490 1500

510 520
 Ile Asp Glu Lys Cys Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu
 ATC GAC GAG AAA TGT AAT GTC TGC TAC AAG CCT GAC CGT ATT GCA CGA TGT ATG TAC GAG
 1510 1520 1530 1540 1550 1560

530 540
 Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys
 TAT TGC CTG AGG GGA CAG CAA GGA TTC TGT GAC CAT GCT TGG GAG TTC AAA AAA GAA TGC
 1570 1580 1590 1600 1610 1620

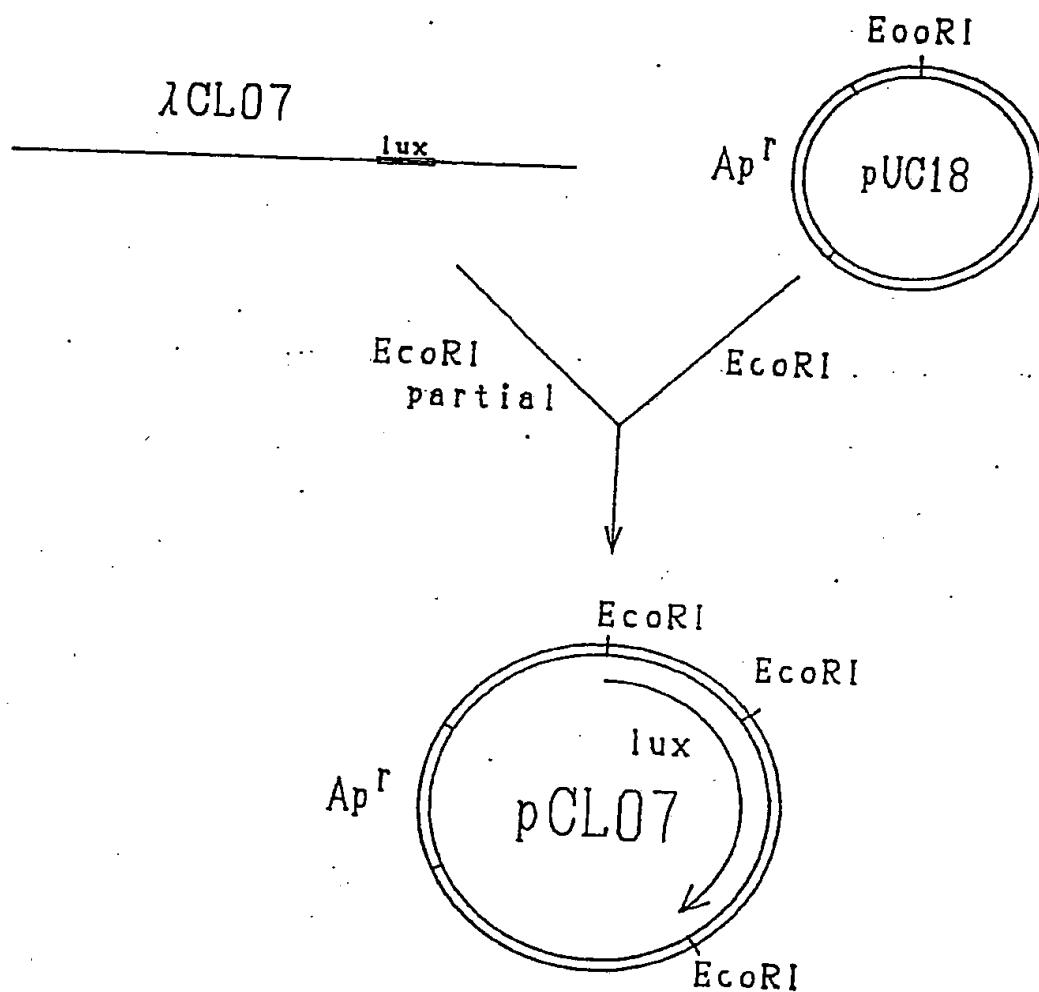
550 555
 Tyr Ile Lys His Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln ***
 TAC ATA AAG CAT GGA GAC ACT CTA GAA GTA CCA CCT GAA TGC CAA TAAATGAACAAAGATAACAG
 1630 1640 1650 1660 1670 1680

AAGCTAACACTACTACAGCAGAACATAAAAGAGAACGCTGTAGTTCTTCAAAAACAGTATATTGATGTAACCATTTGTT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760

1770 1780 1790 1800 1810 1820
 TACTTACATAAAAATAATTGTTATTATCATAACGTAAGAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAA

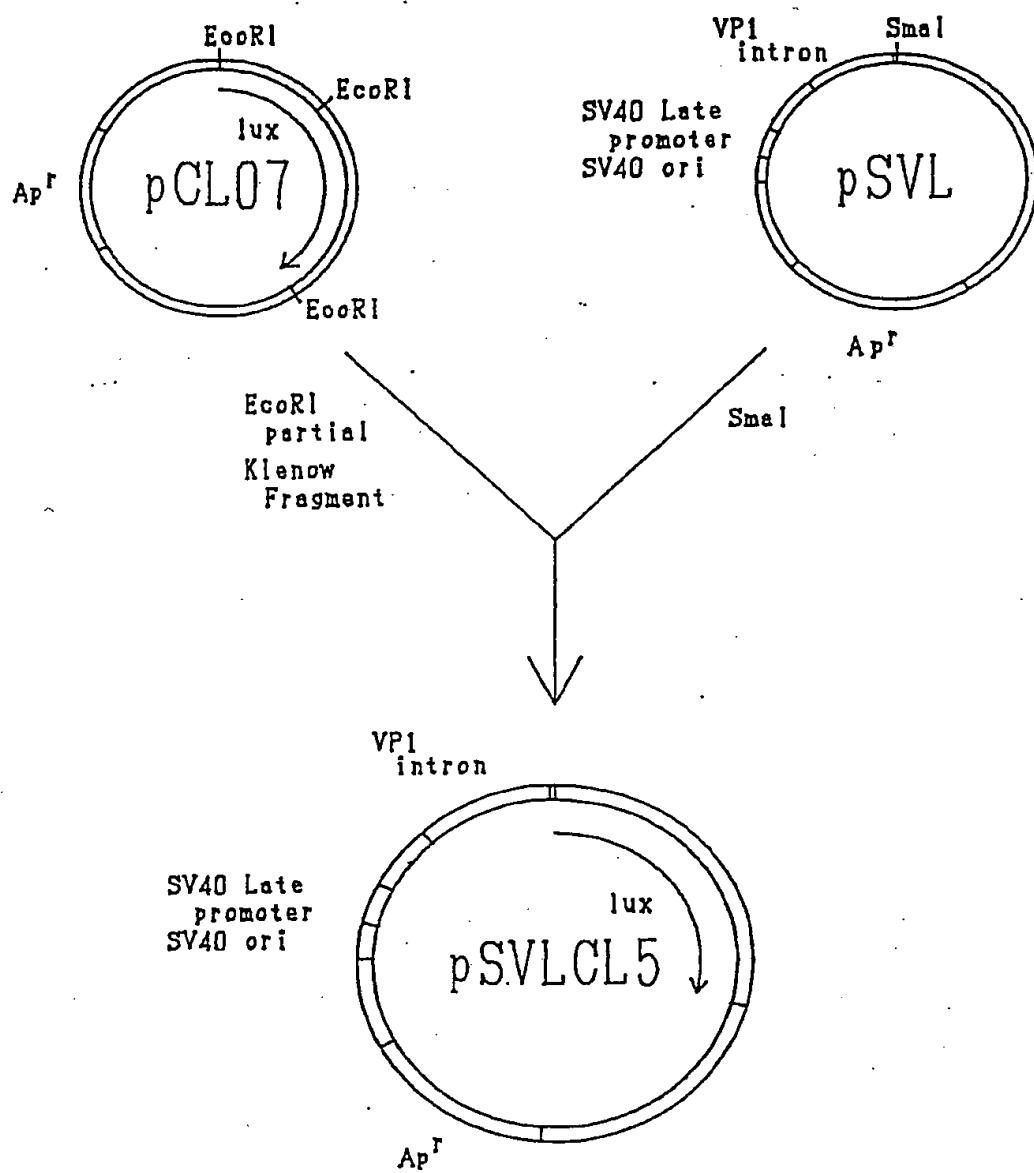
5 / 9

第2図



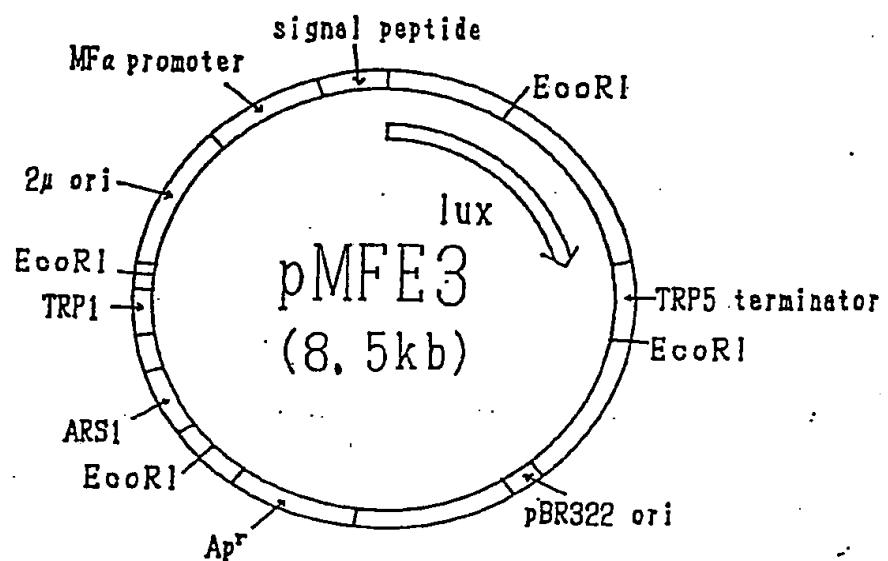
6 / 9

第3図



7 / 9

第4 a図

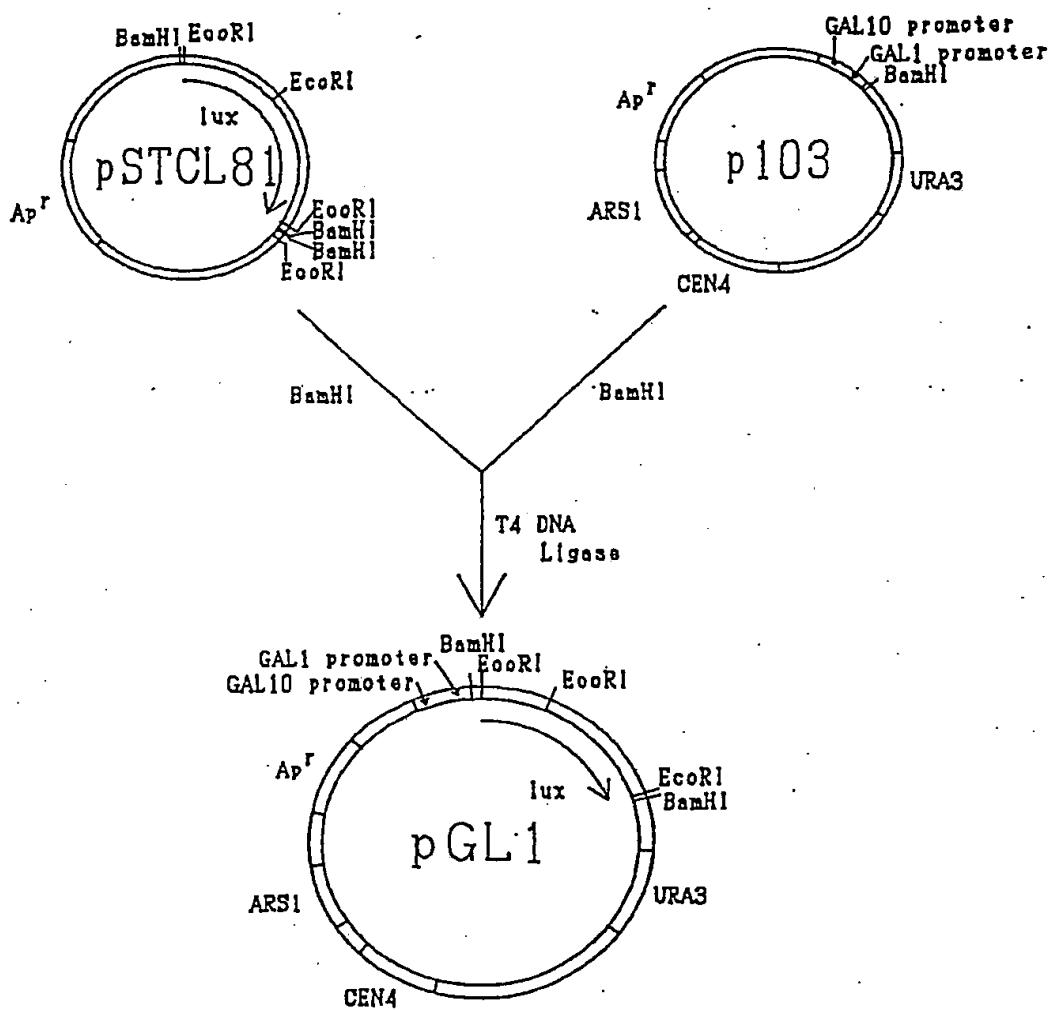


第4 b図

	29	30	31	32	33	
(a) pMFE3A	Met	...	Lys	Arg	Pro	Ser Ser Thr Pro ...
(b) pMFE3B	Met	...	Lys	Arg	---	---
(c) pMFE3C	Met	...	Lys	Arg	---	---
(d) pMFE3D	Met	...	Lys	Arg	---	Ser Ser Thr Pro ...

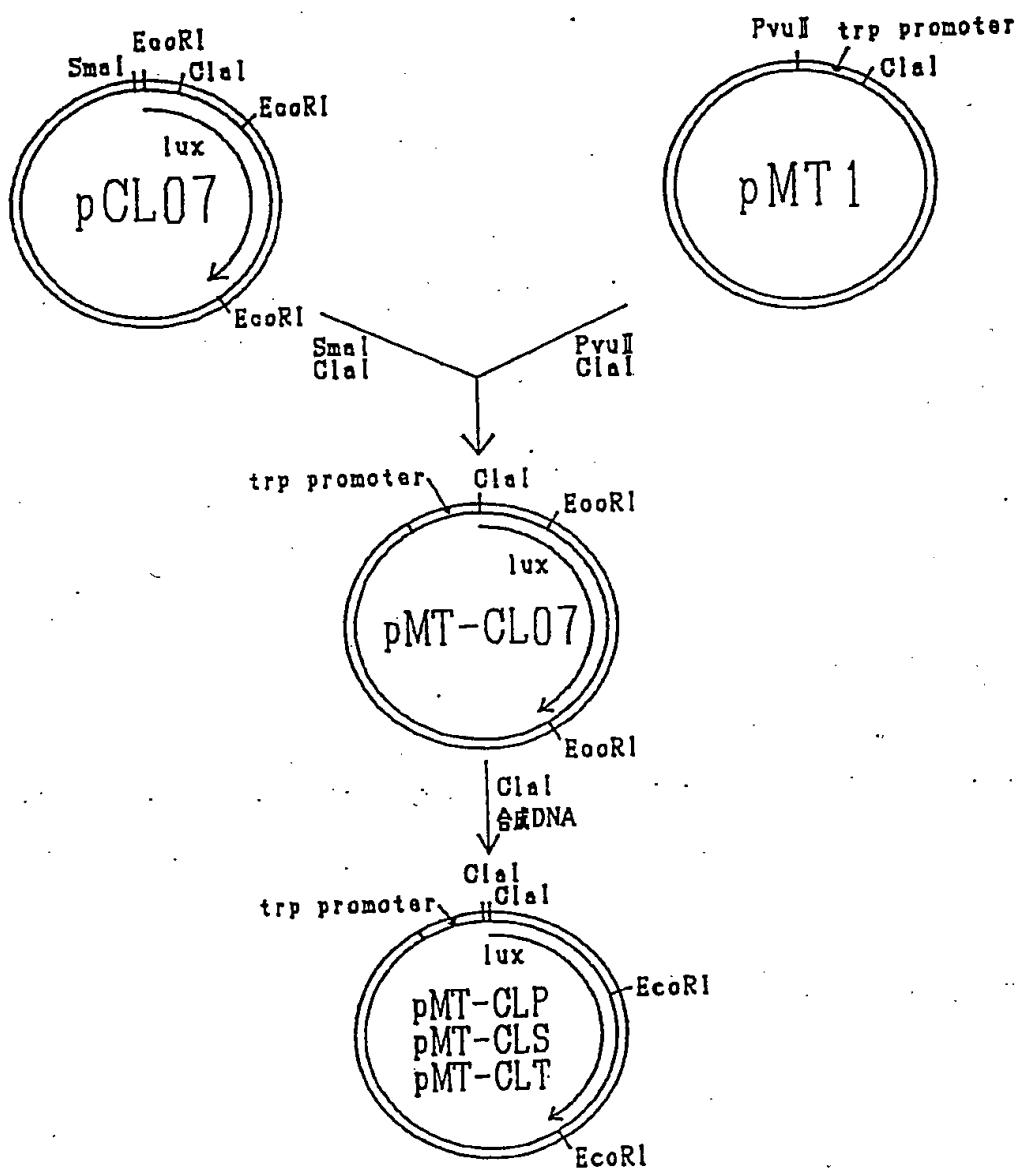
8 / 9

第5図



9 / 9

第6図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP89/00811

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl⁴ C12N9/02, C12N15/00

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched⁷

Classification System	Classification Symbols
IPC	C12N9/02, C12N15/00

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *

COMPUTER SEARCH (CHEMICAL ABSTRACTS, BIOSIS DATABASES,
EMBL-GDB, LASL-GDB AND NBRF-PDB)

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *

Category *	Citation of Document, ¹⁰ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹¹	Relevant to Claim No. ¹²
X, Y	BIOCHEMISTRY, Vol. 13, No. 25, (1974), F.I.Tsuji, et al [Some Properties of Luciferase from the Bioluminescent Crustacean, Cypridina hi/gendorfii] P. 5204 - 5209	1 - 5
A	SCIENCE, Vol. 234, No. 4778, (1986), D.W.Ow, et al [Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants] P. 856 - 859	6 - 12
A	WO, A1, 88/00617 (BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH, INC.) 28 January 1988 (28. 01. 88)	6 - 12

* Special categories of cited documents: ¹⁰

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
September 18, 1989 (18. 09. 89)	October 2, 1989 (02. 10. 89)
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office	

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類(IPC) Int. Cl. C12N9/02, C12N15/00		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C12N9/02, C12N15/00	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
COMPUTER SEARCH(CHEMICAL ABSTRACTS, BIOSIS DATABASES, EMBL-GDB, LASL-GDB AND NBRF-PDB)		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の类别 カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X, Y	BIOCHEMISTRY, 第13巻, 第25号, (1974), F. I. Tsuji, et al 「Some Properties of Luciferase from the Bioluminescent Crustacean Cypridina cf. gendorfii」 P. 5204-5209	1-5
A	SCIENCE, 第234巻, 第4778号, (1986), D. W. Ow, et al 「Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants」 P. 856-859	6-12
A	WO, A1, 88/00617 (BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH, INC.) 28. 1月. 1988 (28. 01. 88)	6-12
■引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献		
「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリーの文献		
IV. 認証		
国際調査を完了した日 18. 09. 89	国際調査報告の発送日 02. 10. 89	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 平田和男	4B 7823